



Title	血管平滑筋からのカルデスマントミオシン軽鎖キナーゼの精製、およびその性質、細胞内分布の検討
Author(s)	山崎、恵司
Citation	大阪大学、1987、博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35765
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	山	崎	恵	司
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	7902	号	
学位授与の日付	昭和	62年	10月	13日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	血管平滑筋からのカルデスモンとミオシン軽鎖キナーゼの精製, およびその性質、細胞内分布の検討			
(主査) 論文審査委員	教 授 森 武貞			
(副査)	教 授 藤田 尚男	教 授 多田 道彦		

論文内容の要旨

[目的]

近年、平滑筋収縮におけるCa²⁺制御は、アクチン側およびミオシン側の両側制御によりなされていることが明らかになるつつある。血管平滑筋のミオシン側制御の存在は明らかであるが、アクチン側制御に関しては、まだ充分な知見が得られていない。そこで今回、血管平滑筋アクチン-ミオシン系のCa²⁺制御を明らかにする目的の一環として、砂のう平滑筋アクチン側制御の主役をなすカルデスモン（以下CaDと略す）とミオシン側制御に重要なミオシン軽鎖キナーゼ（以下MLCKと略す）の血管平滑筋からの簡易精製法を開発し、両蛋白質の性質および血管平滑筋細胞における分布を検討した。

[方法ならびに結果]

1. 血管平滑筋CaD, MLCKの精製

新鮮な牛頸動脈平滑筋100gをミンチし、3倍容の抽出液（50mM imidazole-HCl (pH6.9), 1 mM DTT, 300mM KCl, 2 mM ATP, 0.5mM MgCl₂, 0.25mM PMSF, leupeptin 5 μg/ml, 0.1mM diisopropyl fluorophosphate, SBTI 20 μg/ml）を加え、Waring blenderでホモジナイズした後、40,000xgで30分間遠心し、その上清を硫安分画（30-50%飽和）した。得られた分画を、100mM KClを含む緩衝液（20mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM DTT, 0.2mM CaCl₂, leupeptin 5 μg/ml）で溶解し、105,000xg30分間遠心した上清をカルモデュリンアフィニティカラムにアプライし、Ca²⁺依存性にカルモデュリンに結合する分画を得た。次いで、この分画からTSKgel DEAE-5 PWカラムを用いたHPLCにより、KCl濃度200mMで溶出される粗CaD分画を得た。さらに、KCl濃度を増加して200-250mMの濃度勾配溶出法によりMLCKを精製した。MLCK活性は、[³²P]ATPを用いてニワト

リ砂のうミオシン軽鎖のリン酸化能により測定した。粗CaD分画を再度D E A E - 5 P Wカラムにアプライし、KCl濃度100, 200, 300mMのstepwise elutionを行ない、200mM KClでCaDを溶出した。精製したCaDおよびMLCKは、SDSゲルのデンシトメーターによる測定で、各精製度がそれぞれ98%, 97%であった。収量は、血管平滑筋100g当り各々8-9mg, 2-4mgであった。蛋白定量はLowry法により行った。

2. 性質(ニワトリ砂のう平滑筋との比較)

SDSゲル電気泳動およびゲルクロマトグラフィーによる測定で、砂のうCaDは150kDa/147kDaのヘテロ二量体であるのに対し、血管CaDは148kDaのホモ二量体であった。血管MLCKの分子量は160kDaであり、砂のうMLCKの135kDaに比し、はるかに大きかった。血管CaD, MLCKは、砂のうCaD抗体および砂のうMLCK抗体を用いたイムノプロット法により、砂のう両蛋白質と免疫学的交叉性を示した。血管MLCKは、砂のうMLCKと同様Ca²⁺、カルモデュリン依存性に活性化能を示した。砂のうミオシン軽鎖を基質としたときの血管MLCK活性は、K_m=9.5 μM, V_{max}=12.5 μmol/mg・minで、砂のうMLCKとほぼ同値であった。遠心法により、血管および砂のうCaDはともにF-アクチンと結合し(K_a=1.3~1.7×10⁷M⁻¹, B_{max}=1 CaD/12-14アクチン), K_aおよびB_{max}に有意の差は認められなかった。また、両者ともにCa²⁺濃度に依存してカルモデュリン、F-アクチン間で結合性の変換(フリップ・フロップ結合)を示した。血管および砂のうMLCKはともにF-アクチンに結合するが、血管MLCK(K_a=5.1×10⁶M⁻¹, B_{max}=1 MLCK/12-13アクチン)の方が砂のうMLCK(K_a=9.0×10⁵M⁻¹, B_{max}=1 MLCK/12-13アクチン)よりもF-アクチンに対する親和性が高かった。

3. 細胞内分布

初代培養ラット大動脈平滑筋細胞において、CaD抗体、MLCK抗体を用いた間接免疫蛍光法による細胞内分布を検討したところ、両蛋白質ともアクチン線維束であるストレス線維に局在していた。

[総括]

血管平滑筋収縮におけるCa²⁺制御機構を解明する第一段階として、その調節系の主役をなすと考えられるCaD、MLCKの簡易精製法を開発し、それぞれがニワトリ砂のう平滑筋のものと非常に似た性質を有していることを明らかにした。また、血管平滑筋細胞における分布が、両蛋白質ともストレス線維に局在していることから、CaD、MLCKとともにアクチングリーフィラメントとの機能的関連を通してアクミオシン系制御に関与している可能性が示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究は、砂のう平滑筋アクミオシン系の収縮制御因子であるカルデスモン、ミオシン軽鎖キナーゼを、血管平滑筋より同時に精製する方法を開発し、さらに両蛋白質の性質、細胞内分布を明らかにしたものである。

これまで、血管平滑筋アクミオシン系のCa²⁺制御機作は明らかになっていなかったが、本研究によりその制御因子の存在が示されたもので、今後のCa²⁺制御機構解明に寄与しうるものと評価される。